

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-315570

(43)Date of publication of application : 29.10.2002

(51)Int.Cl.

C12N 1/14
C12N 9/02
// (C12N 1/14
C12R 1:645)

(21)Application number : 2001-125372

(71)Applicant : AKIYAMA YUKITO
NAKAMURA TOMOYUKI

(22)Date of filing : 24.04.2001

(72)Inventor : NAKAMURA TOMOYUKI
AKIYAMA YUKITO

(54) METHOD FOR CULTURING PHELLINUS LINTEUS PRODUCING SOD- LIKE SUBSTANCE AND METHOD FOR PRODUCING SOD-LIKE SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for culturing Phellinus linteus producing a superoxide dismutase(SOD)-like substance in large amounts and a method for producing the SOD-like substance. SOLUTION: (1) This method for culturing a mycelium of Phellinus linteus producing the SOD-like substance is characterized by inoculating the mycelium of Phellinus linteus into a liquid medium and culturing the mycelium under conditions of the following (a) and (b): (a) feeding oxygen to the liquid medium during culture; (b) irradiating the liquid medium with light. (2) This SOD-like substance is obtained from the mycelium and the culture solution.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.06.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] *Phellinus linteus* *Phellinus linteus* which produces the SOD (superoxide dismutase) Mr. matter characterized by inoculating a mycelium into a liquid medium and cultivating according to following (**) and the conditions of (**) The culture approach of a mycelium.

(b) Supply oxygen to the liquid medium under culture.

(b) Irradiate light at a liquid medium.

[Claim 2] *Phellinus linteus* *Phellinus linteus* which produces the SOD Mr. matter characterized by inoculating a mycelium into a liquid medium and cultivating according to following (**) – (Ha) conditions The culture approach of a mycelium.

(b) Supply oxygen to the liquid medium under culture.

(b) Irradiate light at a liquid medium.

(c) Circulate a liquid medium.

[Claim 3] *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 SOD Mr. matter obtained from a mycelium.

[Claim 4] *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 SOD Mr. matter obtained from culture medium.

[Claim 5] *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 The manufacture approach of the SOD Mr. matter characterized by refining a mycelium according to the following process.

A process: The process which extracts a mycelium by ethanol and extracts with ethyl acetate what was obtained at the process B process: A process of removing ethanol [claim 6] *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 The manufacture approach of the SOD Mr. matter characterized by extracting and refining culture medium with ethyl acetate.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention is *Phellinus linteus* which produces the superoxide dismutase (SOD) Mr. matter so much. It is related with the culture approach and the manufacture approach of the SOD Mr. matter.

[0002]

[Description of the Prior Art] SOD (superoxide dismutase) is an enzyme which eliminates the super oxide (O_2 and $-$) which is one of active oxygen and the free radicals (reduction), and is changed into a hydrogen peroxide (H_2O_2). Conventionally, it looks forward to development of drugs and food which the various illnesses in which the rise and fall of the active oxygen produced in the living body participate are known, and singlet oxygen (1O_2), super oxide, a hydrogen peroxide, a hydroxy radical ($HO\cdot$), etc. take in inside of the body, and eliminate active oxygen.

[0003]

[Problem(s) to be Solved] When the artificer etc. was studying the approach of acquiring the mycelium of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) in large quantities in a liquid medium and he cultivated, irradiating light at a culture medium, in a mycelium and culture medium, he knew that the SOD Mr. matter would be produced so much, and completed this invention.

[0004]

[Means for Solving the Problem] The invention in this application is constituted by the claim of following (1) – (6).

Claim 1 : *Phellinus linteus* *Phellinus linteus* which produces the SOD (superoxide dismutase) Mr. matter characterized by inoculating a mycelium into a liquid medium and cultivating according to following (**) and the conditions of (**) The culture approach of a mycelium.

(b) Supply oxygen to the liquid medium under culture.

(b) Irradiate light at a liquid medium.

Claim 2 : *Phellinus linteus* *Phellinus linteus* which produces the SOD Mr. matter characterized by inoculating a mycelium into a liquid medium and cultivating according to following (**) – (Ha) conditions The culture approach of a mycelium.

(b) Supply oxygen to the liquid medium under culture.

(b) Irradiate light at a liquid medium.

(c) Circulate a liquid medium.

Claim 3: *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 SOD Mr. matter obtained from a mycelium.

Claim 4: *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 SOD Mr. matter obtained from culture medium.

Claim 5: *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of claim 1 or claim 2 The manufacture approach of the SOD Mr. matter characterized by refining a mycelium according to the following process.

A process: *Phellinus linteus* obtained by the culture approach of of process claim 6: claim 1 or claim 2 which extracts a mycelium by ethanol and extracts with ethyl acetate what was obtained at the process B process: A process of removing ethanol The manufacture approach of the SOD Mr. matter characterized by extracting and refining culture medium with ethyl acetate.

[0005]

[Embodiment of the Invention] (b) *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) used for the invention in this application used what was saved as PL-08 share after being Suki, Nishi-Morokata-gun, Miyazaki-ken-mura, extracting the fruit body and mycelium-izing at an incorporated company eye BI eye application mushroom lab in October, 1998. this strain — a fruit body — research institute, the Forestry Agency, the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries Department of a forest living thing section forest microorganism having the cystidium of a yellowish brown color peculiar to ** *Phellinus Linteus* fruit body by judgment of Dr. Yukihisa Abe of a decay disease laboratory, and the gestalt of ** basidiospore — since — what was identified *Phellinus Linteus* was

used. The preculture of sample offering strain inoculated into the Potato Dextrose Agar culture medium in a Petri dish with a bore of 90mm (Difco shrine make) the mycelium which had carried out cold storage at 5 degrees C, and carried out surface culture for 15 days under 25-degree-C dark. This culture mycelium was cut off with the cork borer with a bore of 5mm (desiccation mycelium weight equivalent to 0.35mg), and the trial was presented.

[0006] (1) The effectiveness of the light to mycelium growth of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) was investigated.

The culture condition is as follows. *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) was inoculated into the 500ml Erlenmeyer flask which poured the 300ml of the following culture media distributively, and sterilized, aeration of the sterile air which let 0.22-micrometer filter pass was carried out at a rate of 0.5 l/min to it, and the cell mass of *Phellinus Linteus* which grew up was measured.

(b) Medium composition Glucose: 4%, yeast extractives:0.3%, peptone:0.3% KH_2PO_4 : 0.05%, Na_2HPO_4 : 0.05% (pH5.5)

(b) A culture condition (a) -- culture temperature: -- 25 degrees C (b) -- culture scale: -- a 500ml Erlenmeyer flask and 300ml of culture media (c) -- quantity-of-airflow: -- 0.5 l/min (d) -- culture days: -- for 40 days (e) Exposure conditions : Light source : The LED light source made from EYELA, red LED (660nm) illuminance: Eight following partitions of 0-4000LUX 0, 100, 500, 1000, 1500, 2000 3000 4000 (LUX)

Irradiation time: 8 hours / DAY, [0007] The result is shown in drawing 1 (*Phellinus linteus* radiation effects of the light in mycelium (*Phellinus Linteus*) growth). According to drawing 1, when exposure reinforcement exceeds 1000 (LUX), it turns out that fungus body yield decreases. In addition, when the light source used for this invention is not limited to the above-mentioned light source and the usual visible ray was irradiated, it was enough, but when blue LED (470nm) was irradiated, it was in the inclination bronzed while growth of a mycelium is overdue (aging), and the mycelium growth of the far-infrared color LED (735nm) suited to the late inclination.

[0008] (2) *Phellinus Linteus* was cultivated on condition that the medium composition of said (**), and following (**), and the desiccation mycelium of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) was obtained (10.2 g/L).

This obtained mycelium is displayed as "PL-L" below.

(b) Medium composition : it is the same as said (b).

(b) Culture condition (a) culture temperature: 25 degrees C (b) culture scale: 1000L (refer to drawing 2)

(c) Quantity of airflow : 35 L/min (d) culture days: 20 days (e) exposure conditions: Light source: The LED light source made from EYELA, red LED (660nm)

Illuminance: 1000LUX Irradiation time: 8 hours / DAY Illuminance: *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) was cultivated and the desiccation mycelium was obtained without irradiating light on the other hand using the same medium composition as the above, and culture condition (a) - (d) 1000 LUX (8.3 g/L). This obtained mycelium is displayed as "PL-nonL" below. Moreover, "PL-nonL-20day" expresses the mycelium cultivated on the 20th, without irradiating light.

[0009] (c) The centrifugal separator separated the mycelium cultivated the above condition, ethanol was added to this, the mycelium was crushed by the mixer, and it put for 24 hours. After collecting ethanol fractionation with the centrifugal separator after that, removing ethanol and ethyl acetate's extracting residue, ethyl acetate was removed and it considered as the sample for antioxidation active substance measurement. In addition, the sample for antioxidation active substance measurement was prepared also about what processed the culture medium (medium) before the *Phellinus Linteus* inoculation with ethanol and ethyl acetate like the mycelium. two samples ("PL-nonL-20day", "PL-L-20day") of said mycelium, and the ethanol solution of "medium" -- electron spin resonance (ESR) -- it asked for the rate of super oxide (O_2 and \cdot) elimination (SOD Mr. operation) by law. electron spin resonance (ESR) -- measurement of the super oxide (O_2 and \cdot) by law the approach (Kazuo Ouchi and edit: -- living thing pharmaceutical chemistry experiment lecture inflammation and allergy [] -- p.218-p.223 (Hirokawa bookstore) --) using a spin-trapping agent and DMPO (5 and 5-dimethyl-pyrroline-N-oxide) It carried out by Bull.Chem.Soc.Jpn., 63,187-191 (1990), BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL Vol.42, No.1, and P.35-44 (1997).

[0010] The result is shown in drawing 3. According to drawing 3, the mycelium (PL-nonL-20day) cultivated without the mycelium (PL-L-20day) of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) which irradiated light and cultivated it irradiating light shows that the value of the rate of super oxide (O_2 and \cdot) elimination is large.

[0011] (3) *Phellinus linteus* of a paragraph 0008 The concentration test of the SOD Mr. matter was performed about the mycelium and culture filtrate which were obtained by culture (*Phellinus Linteus*) (what irradiated light).

(b) About the mycelium, 4 fractionation of "PL-F1", "PL-F2", "PL-F3", and "PL-F4" was obtained with the procedure of drawing 4.

(b) Moreover, about the culture filtrate except a mycelium, 3 fractionation of "PL-F5", "PL-F6", and "PL-F7" was obtained with the procedure of drawing 5.

[0012] a part for 7-minute formation of these "PL-F1" - "PL-F7" -- a paragraph 0009 -- the same -- electron spin resonance (ESR) -- it asked for the rate of super oxide (O_2 and \cdot) elimination (SOD Mr. operation) by law. The result is shown in drawing 6. As for the value of the rate of super oxide (O_2 and \cdot) elimination, according to

drawing 6 , it turns out that the value for 2-minute formation of "PL-F2" and "PL-F6" is large as compared with other components.

[0013] in addition, electron spin resonance (ESR) -- the actual measurement chart of the super oxide (O₂ and -) by law is shown in drawing 7 - drawing 18 . The measurement result from which drawing 7 - drawing 10 serve as a basis of the rate (%) calculation of super oxide elimination shown in drawing 3 , drawing 11 - drawing 18 are the measurement charts used as the calculation basis of the rate of super oxide elimination (%) shown in drawing 6 .

[0014]

[Effect of the Invention] As mentioned above, according to the culture approach of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*) which produces the SOD Mr. matter of the invention in this application, and the manufacture approach of the SOD Mr. matter, while being able to make the mycelium culture of *Phellinus linteus* (*Phellinus Linteus*), and its culture medium produce the SOD Mr. matter so much, it has the effectiveness referred to as being able to condense the produced SOD Mr. matter efficiently.

[Translation done.]

*.NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Phellinus linteus It is drawing showing the optical radiation effects in mycelium (Phellinus Linteus) growth.

[Drawing 2] It is this schematic drawing of the culture apparatus of Phellinus linteus (Phellinus Linteus).

[Drawing 3] It is drawing showing the value of the rate of super oxide (O₂ and -) elimination.

[Drawing 4] It is this schematic drawing showing the procedure which condenses the SOD Mr. matter from a mycelium.

[Drawing 5] It is this schematic drawing showing the procedure which condenses the SOD Mr. matter from culture medium.

[Drawing 6] It is drawing showing the value of the rate of super oxide (O₂ and -) elimination.

[Drawing 7] sample additive-free super oxide -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing (control) measured by law.

[Drawing 8] the super oxide elimination ability of "medium" -- electron spin resonance (ESR) -- law -- constant -- it is a Fig. the bottom.

[Drawing 9] the super oxide elimination ability of "PL-nonL-20day" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 10] the super oxide elimination ability of "PL-L-20day" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 11] sample additive-free super oxide -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing (control) measured by law.

[Drawing 12] the super oxide elimination ability of "PL-F1" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 13] the super oxide elimination ability of "PL-F2" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 14] the super oxide elimination ability of "PL-F3" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 15] the super oxide elimination ability of "PL-F4" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 16] the super oxide elimination ability of "PL-F5" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 17] the super oxide elimination ability of "PL-F6" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Drawing 18] the super oxide elimination ability of "PL-F7" -- electron spin resonance (ESR) -- it is drawing measured by law.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-315570
(P2002-315570A)

(43)公開日 平成14年10月29日(2002. 10. 29)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 1/14		C 1 2 N 1/14	B 4 B 0 5 0
9/02		9/02	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/14		C 1 2 R 1: 645	
C 1 2 R 1: 645)			

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 19 頁)

(21)出願番号 特願2001-125372(P2001-125372)

(22)出願日 平成13年 4 月24日(2001. 4. 24)

(71)出願人 500003176
秋山 幸仁
山梨県韮崎市円野町上円井1891
(71)出願人 500003165
中村 友幸
山梨県東八代郡八代町岡592
(72)発明者 中村 友幸
山梨県東八代郡八代町岡592
(72)発明者 秋山 幸仁
山梨県韮崎市円野町上円井1891
(74)代理人 100083817
弁理士 今野 耕哉 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SOD様物質を生産するPhellinus linteusの培養方法及びSOD様物質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 この発明は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様物質を多量に生産するPhellinus linteus(メシマコブ)の培養方法及びSOD様物質の製造方法に関するものである。

【構成】 (1) Phellinus linteus の菌糸体を液体培地に接種して、下記の(イ)及び(ロ)の条件により培養することを特徴とするSOD(スーパーオキシドジスムターゼ)様物質を生産するPhellinus linteus の菌糸体の培養方法。

(イ) 培養中の液体培地に酸素を供給すること。

(ロ) 液体培地に光を照射すること。

(2) 前記菌糸体及び培養液から得られるSOD様物質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 *Phellinus linteus* の菌糸体を液体培地に接種して、下記の（イ）及び（ロ）の条件により培養することを特徴とする SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）様物質を生産する *Phellinus linteus* の菌糸体の培養方法。

（イ）培養中の液体培地に酸素を供給すること。

（ロ）液体培地に光を照射すること。

【請求項 2】 *Phellinus linteus* の菌糸体を液体培地に接種して、下記の（イ）～（ハ）の条件により培養することを特徴とする SOD 様物質を生産する *Phellinus linteus* の菌糸体の培養方法。

（イ）培養中の液体培地に酸素を供給すること。

（ロ）液体培地に光を照射すること。

（ハ）液体培地を対流させること。

【請求項 3】 請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の菌糸体から得られる SOD 様物質。

【請求項 4】 請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の培養液から得られる SOD 様物質。

【請求項 5】 請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の菌糸体を下記の工程により精製することを特徴とする SOD 様物質の製造方法。
A 工程：菌糸体をエタノールで抽出し、エタノールを除去する工程
B 工程：A 工程で得られたものを酢酸エチルで抽出する工程

【請求項 6】 請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の培養液を酢酸エチルで抽出して精製することを特徴とする SOD 様物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）様物質を多量に生産する *Phellinus linteus* の培養方法及び SOD 様物質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）は、活性酸素・フリーラジカルのひとつであるスーパーオキシド（ O_2^- ）を消去（還元）して、過酸化水素（ H_2O_2 ）に変える酵素である。従来、一重項酸素（ 1O_2 ）、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル（ $HO\cdot$ ）等、生体内に生ずる活性酸素の消長が関与する多種多様の疾病が知られており、体内に摂取して活性酸素を消去する医薬品や食品の開発が待望されている。

【0003】

【解決しようとする課題】発明者等は、*Phellinus linteus*

us（メシマコブ）の菌糸体を、液体培地中で大量に取得する方法を研究している際、培地に光を照射しながら培養すると、菌糸体、及び培養液中に SOD 様物質が多量に生産されることを知り本発明を完成した。

【0004】

【課題を解決するための手段】本願発明は下記の（1）～（6）の請求項により構成されている。

請求項 1：*Phellinus linteus* の菌糸体を液体培地に接種して、下記の（イ）及び（ロ）の条件により培養することを特徴とする SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）様物質を生産する *Phellinus linteus* の菌糸体の培養方法。

（イ）培養中の液体培地に酸素を供給すること。

（ロ）液体培地に光を照射すること。

請求項 2：*Phellinus linteus* の菌糸体を液体培地に接種して、下記の（イ）～（ハ）の条件により培養することを特徴とする SOD 様物質を生産する *Phellinus linteus* の菌糸体の培養方法。

（イ）培養中の液体培地に酸素を供給すること。

（ロ）液体培地に光を照射すること。

（ハ）液体培地を対流させること。

請求項 3：請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の菌糸体から得られる SOD 様物質。

請求項 4：請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の培養液から得られる SOD 様物質。

請求項 5：請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の菌糸体を下記の工程により精製することを特徴とする SOD 様物質の製造方法。

A 工程：菌糸体をエタノールで抽出し、エタノールを除去する工程

B 工程：A 工程で得られたものを酢酸エチルで抽出する工程

請求項 6：請求項 1 又は請求項 2 の培養方法により得られる *Phellinus linteus* の培養液を酢酸エチルで抽出して精製することを特徴とする SOD 様物質の製造方法。

【0005】

【発明の実施の形態】（イ）本願発明に用いた *Phellinus linteus*（メシマコブ）は、1998 年 10 月に宮崎県西諸県郡須木村で、子実体を採取し、株式会社アイ・ビー・アイ応用きのこ研究所で菌糸体化した上で PL-08 株として保存していたものを使用した。この菌株は、子実体を農林水産省林野庁総合研究所 森林生物部 森林微生物科 腐朽病害研究室の阿部恭久博士の鑑定により、①メシマコブ子実体に特有の黄褐色の剛毛体を持つこと、及び②担子胞子の形態、からメシマコブと同定されたものを用いた。供試菌株の前培養は、5℃で低温保存してあった菌糸体を、内径 90 mm のペトリ皿内の Potato Dextrose Agar 培地（Difco 社製）へ接種して、

25℃暗黒下で15日間表面培養した。この培養菌糸体を内径5mmのコルクボーラーで切り取り（乾燥菌糸体重量 0.35mgに相当）、試験に供した。

【0006】(1) *Phellinus linteus* (メシマコブ) の菌糸体成長に対する光の効果調べた。

(イ) 培地組成

グルコース：4%，イーストエキス：0.3%，ペプトン：0.3%，
KH₂PO₄：0.05%，Na₂HPO₄：0.05% (pH5.5)

(ロ) 培養条件

- (a) 培養温度：25℃
- (b) 培養規模：500mlの三角フラスコ，培地300ml
- (c) 通気量：0.5l/min
- (d) 培養日数：40日
- (e) 照射条件：

光源：EYELA社製LED光源、赤色LED (660nm)

照度：下記の0～4000LUXの8区分

0, 100, 500, 1000, 1500, 2000,
3000, 4000 (LUX)

照射時間：8時間/DAY,

【0007】その結果を図1 (*Phellinus linteus* (メシマコブ) 菌糸体成長における光の照射効果) に示す。図1によれば、照射強度が1000 (LUX) を越えると、菌体収量が減少することがわかる。なお、本発明に用いる光源は上記の光源に限定されるものではなく、通常の可視光線を照射すれば十分であるが、青色LED (470nm) を照射すると、菌糸体の成長が遅れると

(イ) 培地組成：前記 (イ) と同じ。

(ロ) 培養条件

- (a) 培養温度：25℃
- (b) 培養規模：1000L (図2参照)
- (c) 通気量：35L/min
- (d) 培養日数：20日
- (e) 照射条件：

光源：EYELA社製LED光源、赤色LED (660nm)

照度：1000LUX

照射時間：8時間/DAY

照度：1000LUX

一方、前記と同じ培地組成及び培養条件 (a) ～ (d) を用い、光を照射しないで、*Phellinus linteus* (メシマコブ) を培養し、乾燥菌糸体を得た (8.3g/L)。得られたこの菌糸体を、以下「PL-nonL」と表示する。又、例えば「PL-nonL-20day」は、光を照射せずに20日培養した菌糸体を表す。

【0009】(ハ) 以上の条件で培養した菌糸体を、遠心分離機により分離し、これにエタノールを加えて、ミキサーにより菌糸体を破碎し、24時間静置した。その後遠心分離機によりエタノール分画を集め、エタノールを除去し、残渣を酢酸エチルで抽出した後、酢酸エチルを除去して、抗酸化活性物質測定用サンプルとした。なお、メシマコブ接種前の培養基 (medium) を菌糸

培養条件は下記のとおりである。下記の培地300mlを分注して滅菌した500mlの三角フラスコへ、*Phellinus linteus* (メシマコブ) を接種し、0.22μmフィルターを通した無菌空気を、0.5l/minの割合で通気し、成育したメシマコブの菌体量を測定した。

共に褐色化 (老化) する傾向にあり、遠赤外色LED (735nm) は菌糸体成長が遅い傾向にあった。

【0008】(2) メシマコブを、前記 (イ) の培地組成と下記の (ロ) の条件で培養し、*Phellinus linteus* (メシマコブ) の乾燥菌糸体を得た (10.2g/L)。

得られたこの菌糸体を、以下「PL-L」と表示する。

体と同様にエタノールと酢酸エチルで処理したものについても抗酸化活性物質測定用サンプルを調製した。前記菌糸体の2試料 (「PL-nonL-20day」, 「PL-L-20day」) 及び、「medium」のエタノール溶液について、電子スピン共鳴 (ESR) 法により、スーパーオキシド (O₂^{·-}) 消去率 (SOD様作用) を求めた。電子スピン共鳴 (ESR) 法によるスーパーオキシド (O₂^{·-}) の測定は、スピントラッピング剤、DMPO (5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide) を用いる方法 (大内和雄・編集：生物薬化学実験講座 炎症とアレルギー p. 218-p. 223 (広川書店), Bull.Chem.Soc.Jpn., 63, 187-191 (1990), BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL Vol.4

2, No. 1, P. 35-44, (1997))で行なった。

【0010】その結果を図3に示す。図3によれば、光を照射して培養した*Phellinus linteus* (メシマコブ)の菌糸体(PL-L-20day)は、光を照射しないで培養した菌糸体(PL-nonL-20day)よりも、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)消去率の値が大きくなっていることがわかる。

【0011】(3)段落0008の*Phellinus linteus* (メシマコブ)培養(光りを照射したもの)により得られた菌糸体と培養濾液について、SOD様物質の濃縮試験を行った。

(イ)菌糸体については、図4の手順により、「PL-F1」, 「PL-F2」, 「PL-F3」, 「PL-F4」の4分画を得た。

(ロ)又、菌糸体を除いた培養濾液については、図5の手順により、「PL-F5」, 「PL-F6」, 「PL-F7」の3分画を得た。

【0012】これらの「PL-F1」～「PL-F7」の7分画成分について、段落0009と同様に、電子スピン共鳴(ESR)法により、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)消去率(SOD様作用)を求めた。その結果を図6に示す。図6によれば、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)消去率の値は、「PL-F2」及び「PL-F6」の2分画成分の値が、他の成分に比較して大きくなっていることがわかる。

【0013】なお、電子スピン共鳴(ESR)法によるスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)の実際の測定チャートを図7～図18に示す。図7～図10は、図3に示したスーパーオキシド消去率(%)算出の根拠となる測定結果、図11～図18は、図6に示したスーパーオキシド消去率(%)の算出根拠となる測定チャートである。

【0014】

【発明の効果】以上のように、本願発明のSOD様物質を生産する*Phellinus linteus* (メシマコブ)の培養方法及びSOD様物質の製造方法によれば、*Phellinus linteus* (メシマコブ)の菌糸体培養物及びその培養液にSOD様物質を多量に生産させることができると共に、生産されたSOD様物質を効率よく濃縮することができるという効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】*Phellinus linteus* (メシマコブ)菌糸体成長における光照射効果を示す図である。

【図2】*Phellinus linteus* (メシマコブ)の培養装置の該略図である。

【図3】スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)消去率の値を示す図である。

【図4】菌糸体からSOD様物質を濃縮する手順を示す該略図である。

【図5】培養液からSOD様物質を濃縮する手順を示す該略図である。

【図6】スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)消去率の値を示す図である。

【図7】試料無添加のスーパーオキシドを電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図(コントロール)である。

【図8】「medium」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で定した図である。

【図9】「PL-nonL-20day」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図10】「PL-L-20day」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図11】試料無添加のスーパーオキシドを電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図(コントロール)である。

【図12】「PL-F1」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図13】「PL-F2」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図14】「PL-F3」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

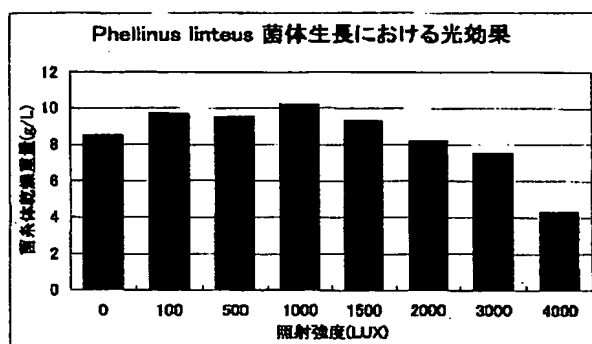
【図15】「PL-F4」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図16】「PL-F5」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

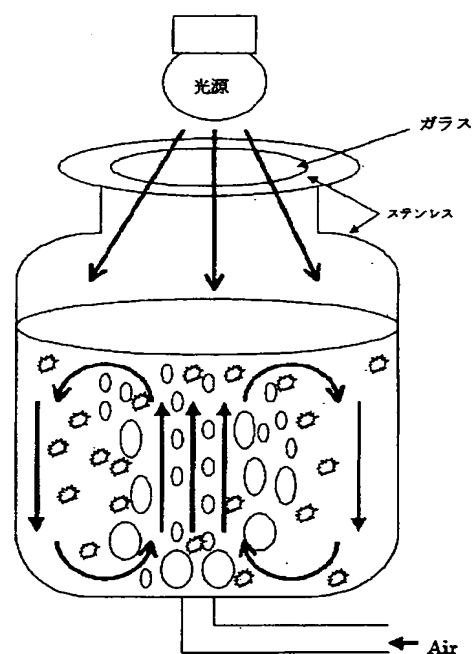
【図17】「PL-F6」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

【図18】「PL-F7」のスーパーオキシド消去能を電子スピン共鳴(ESR)法で測定した図である。

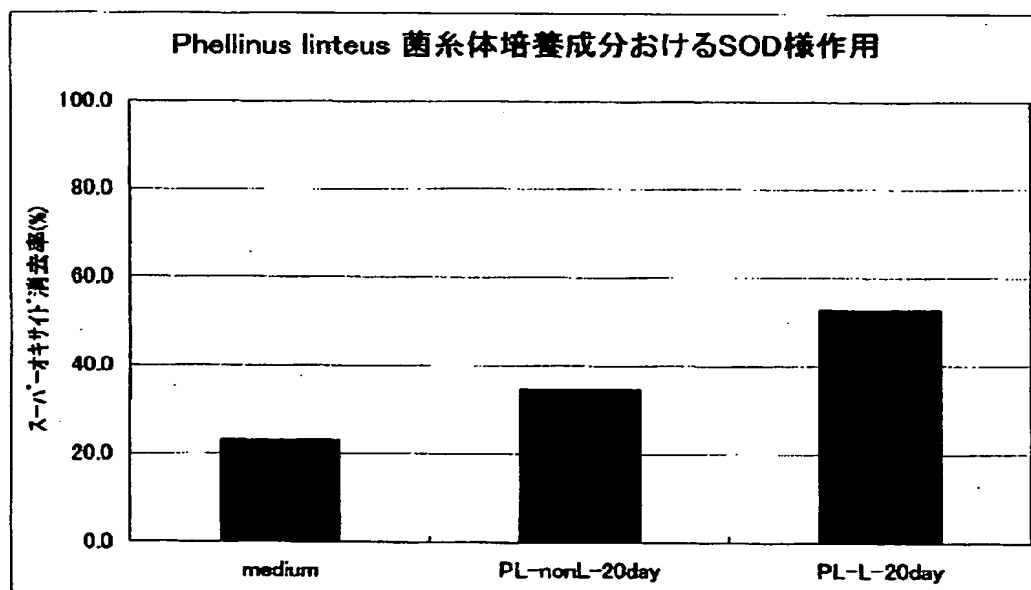
【図1】



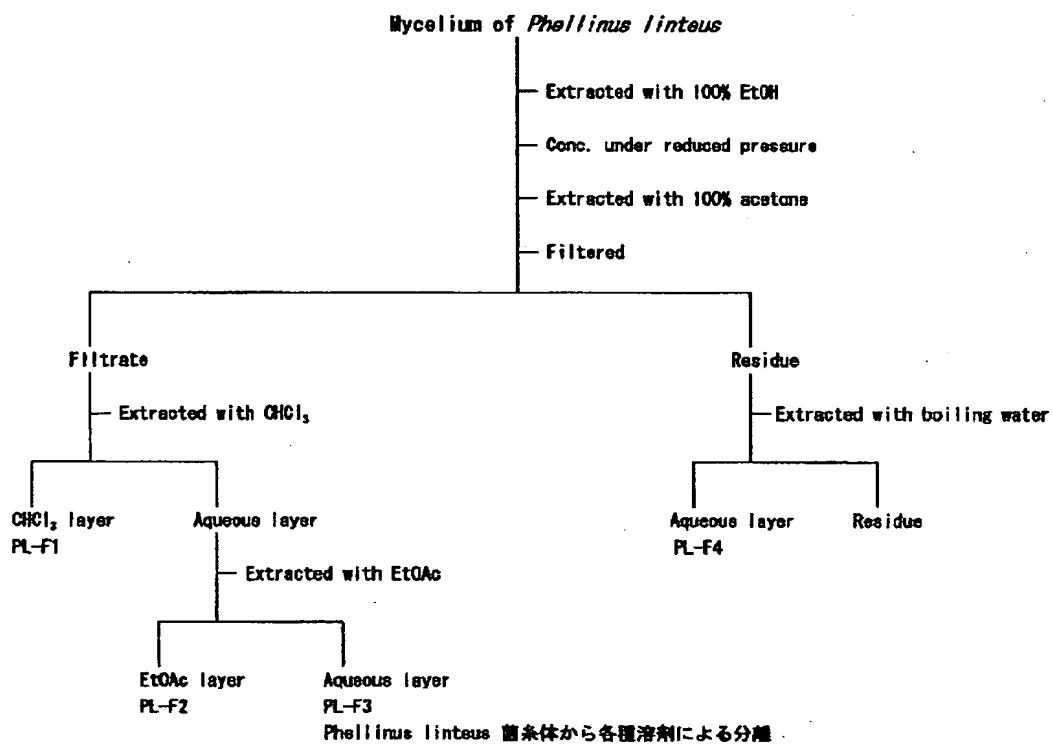
【図2】



【図3】

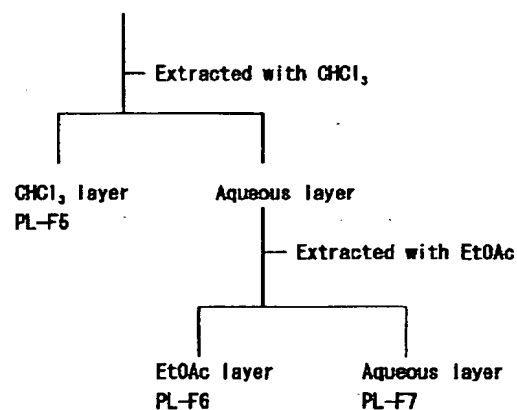


【図 4】



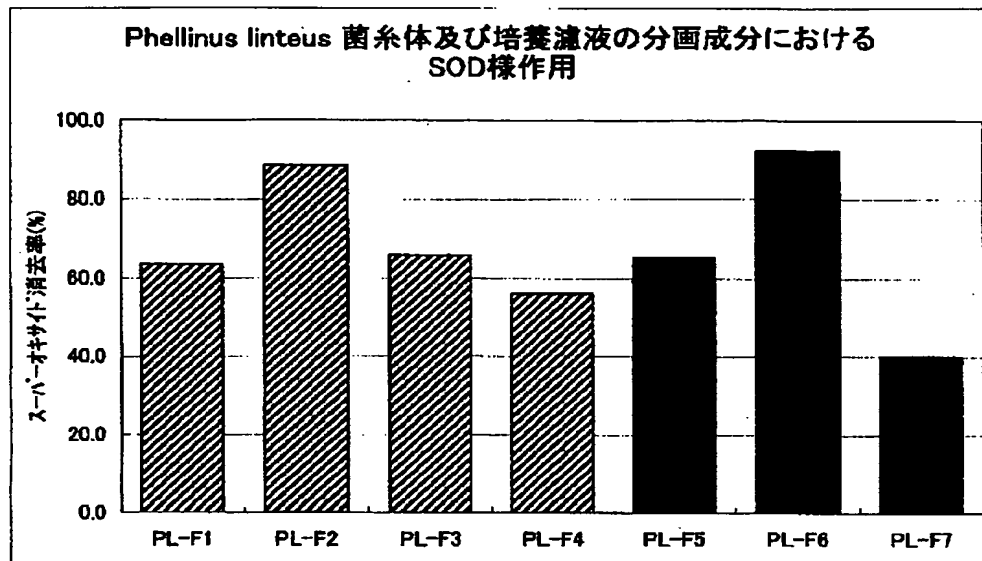
【図 5】

Culture filtrate of *Phellinus linteus*

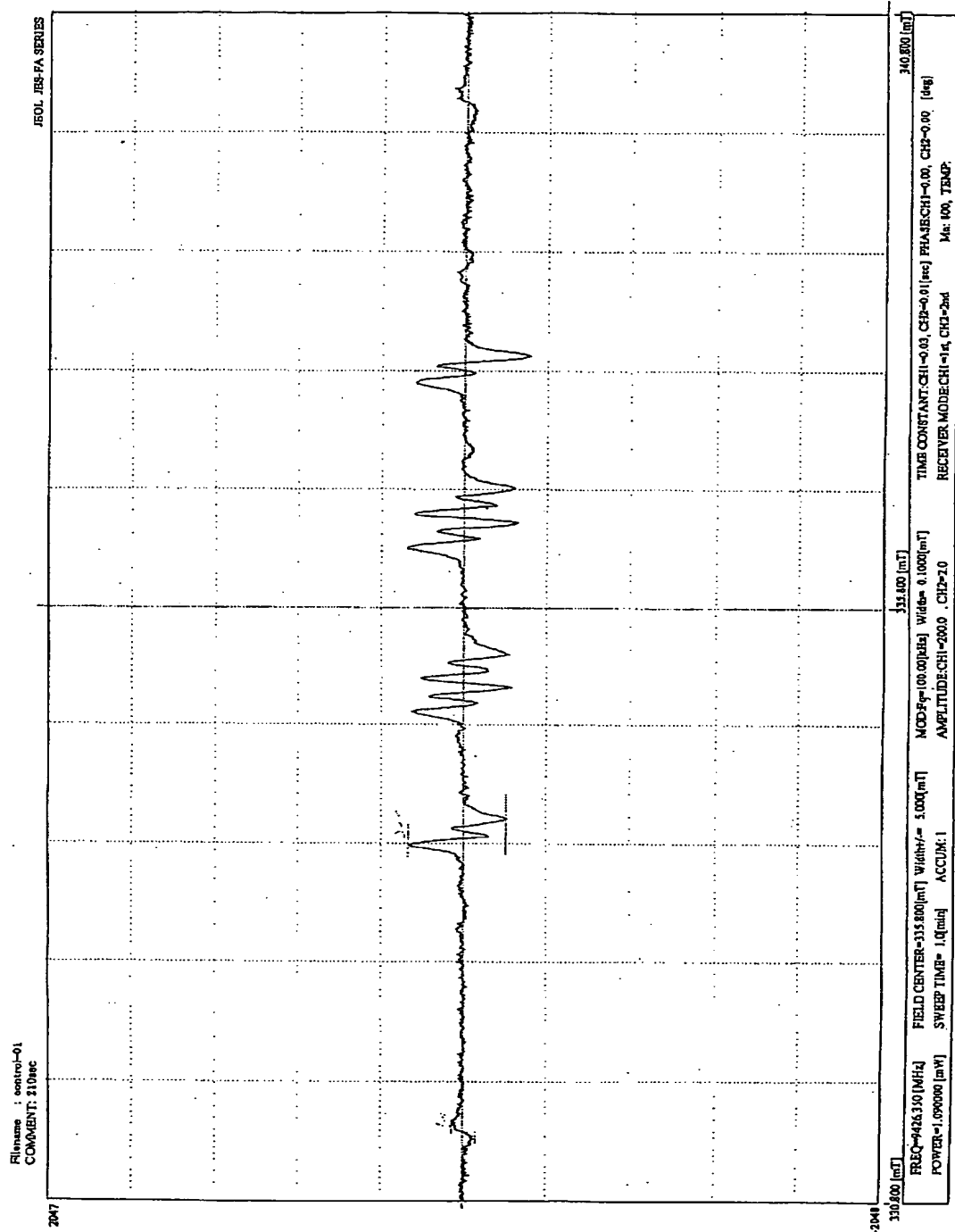


Phellinus linteus 培養濾液から各種溶剤による分離

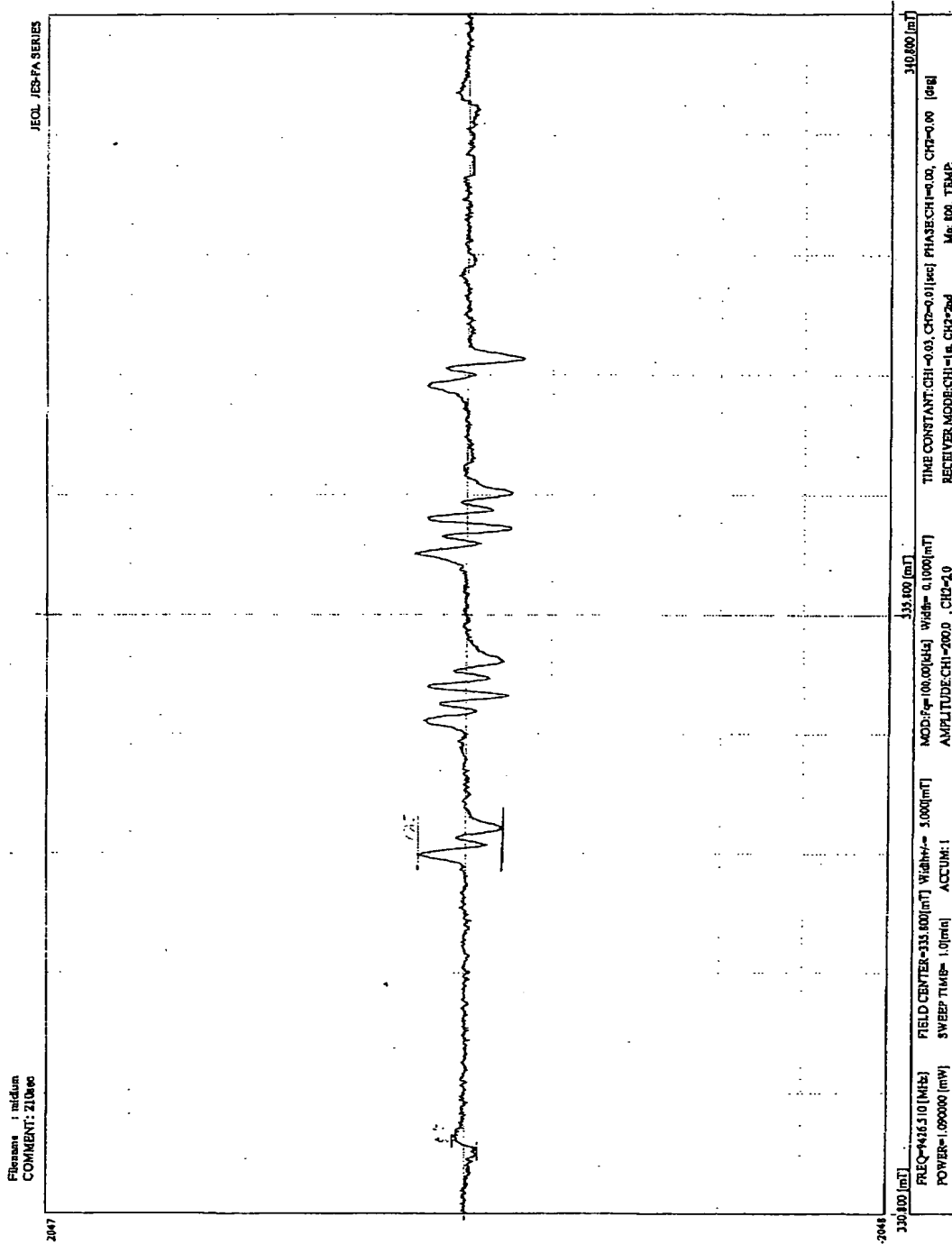
【図6】



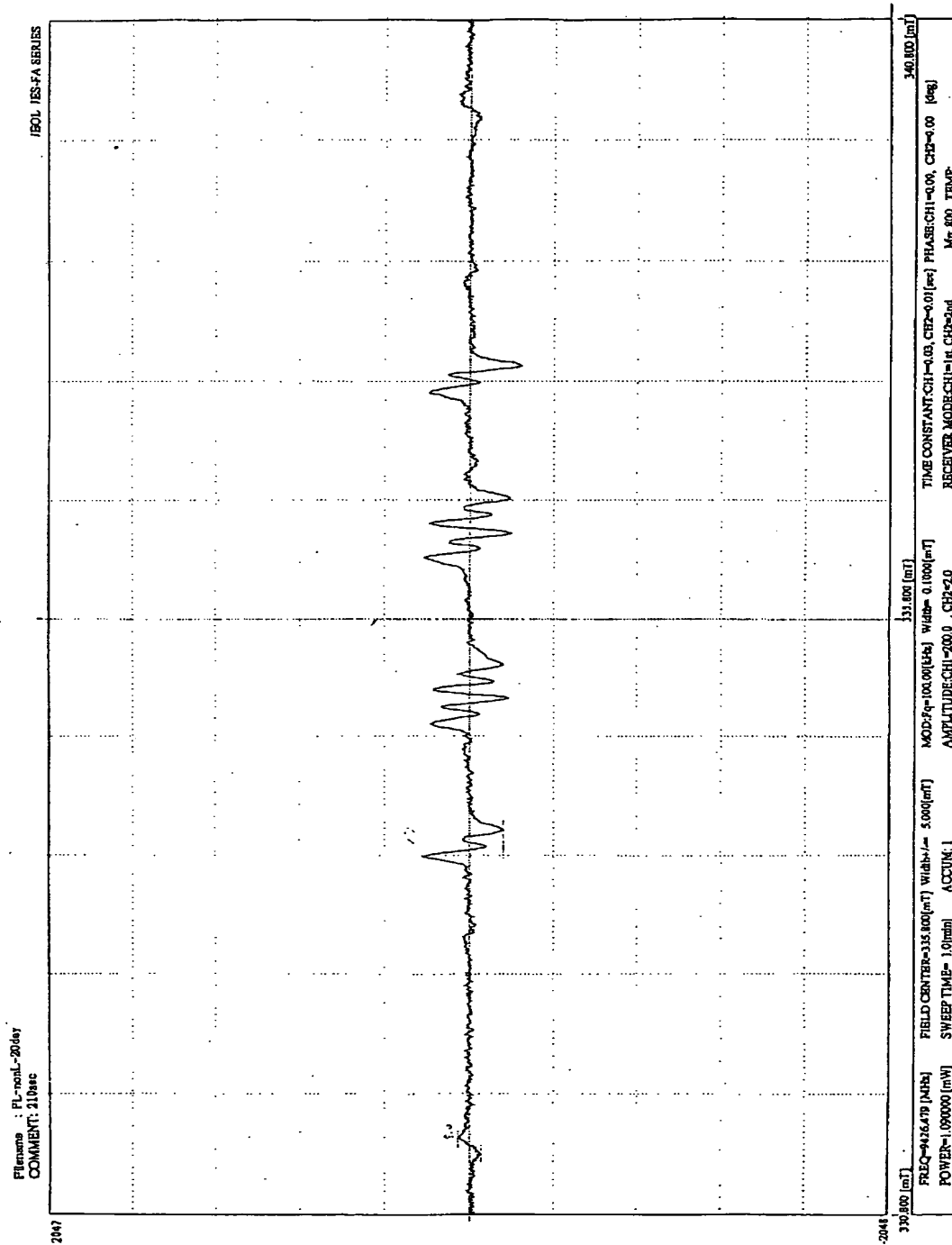
【図7】



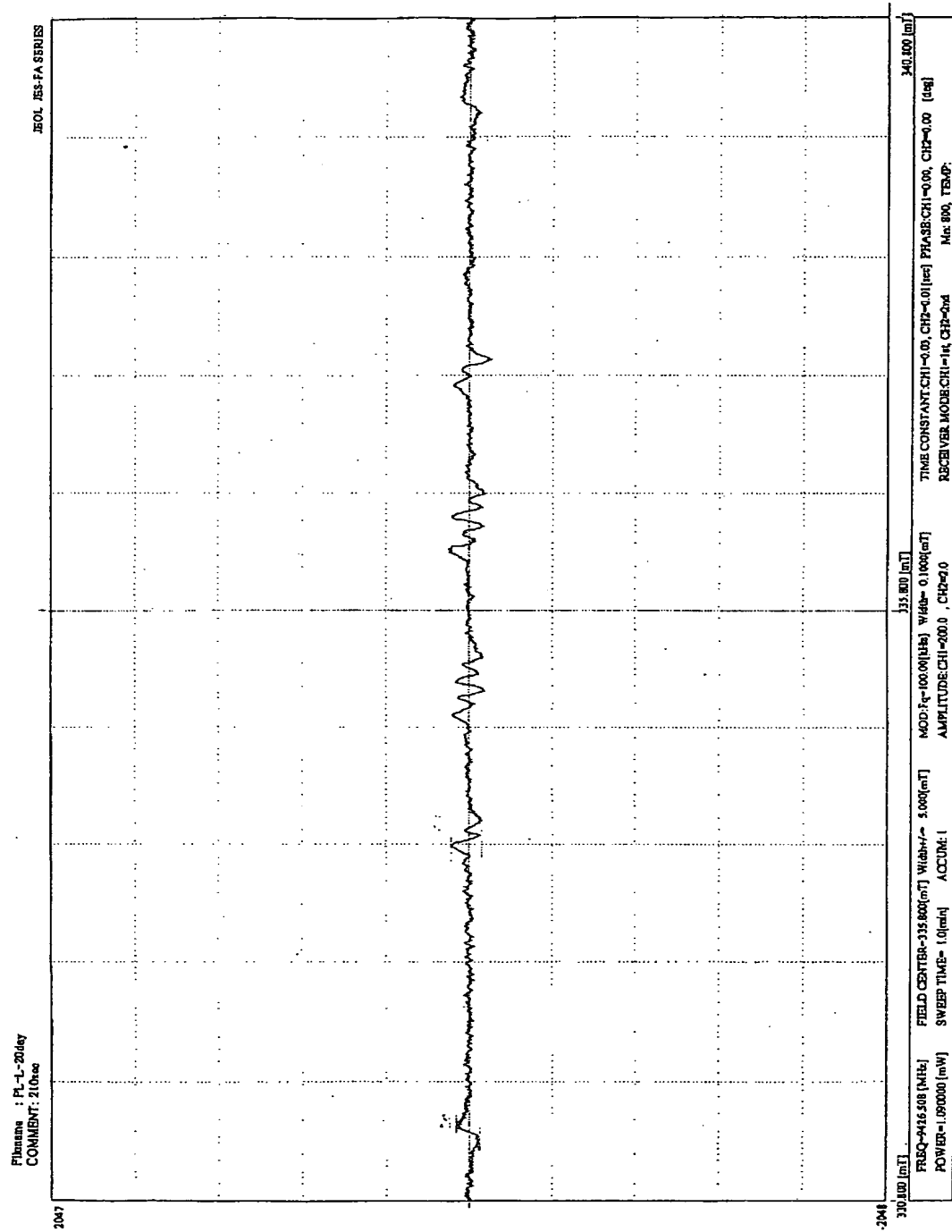
【図 8】



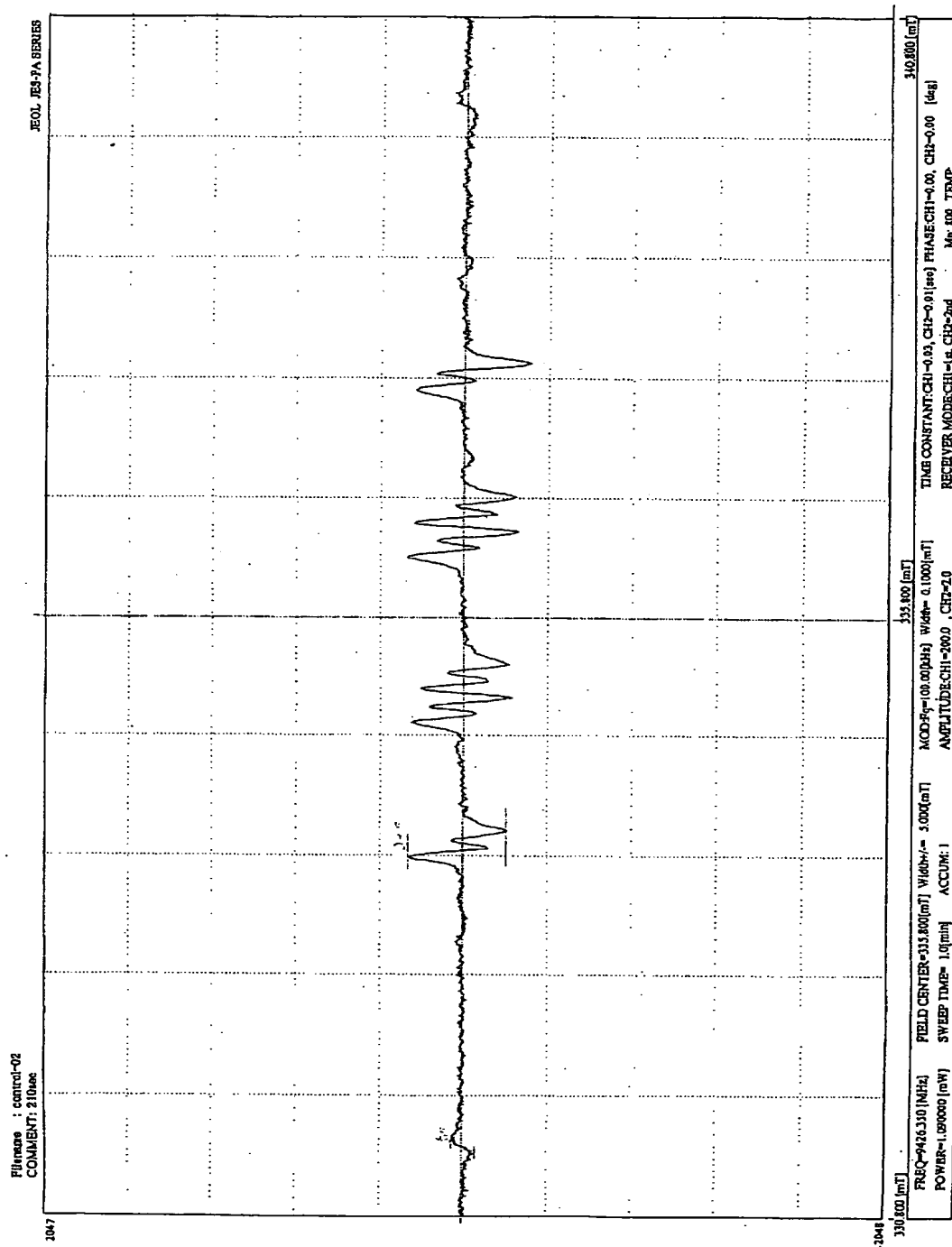
【図9】



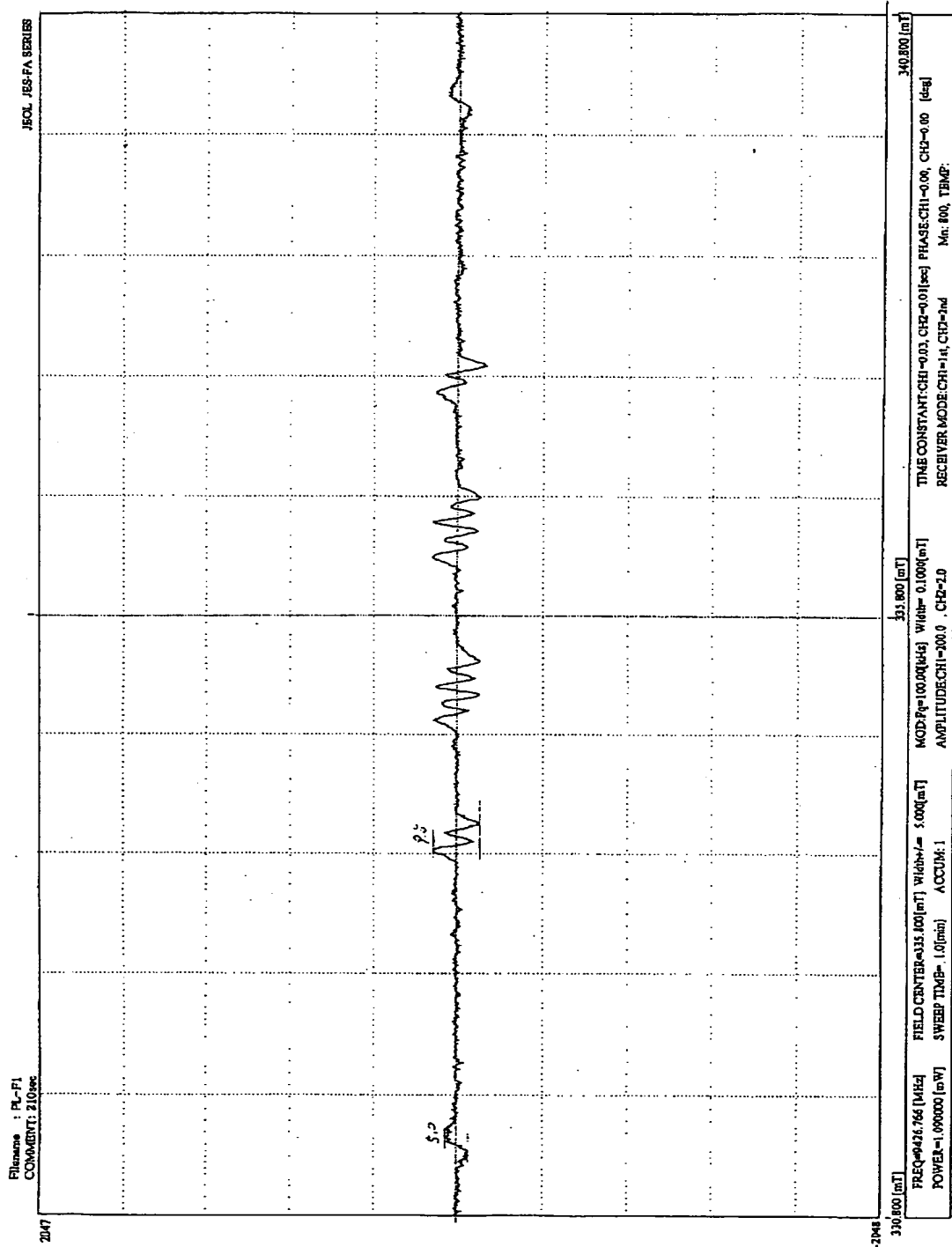
【図10】



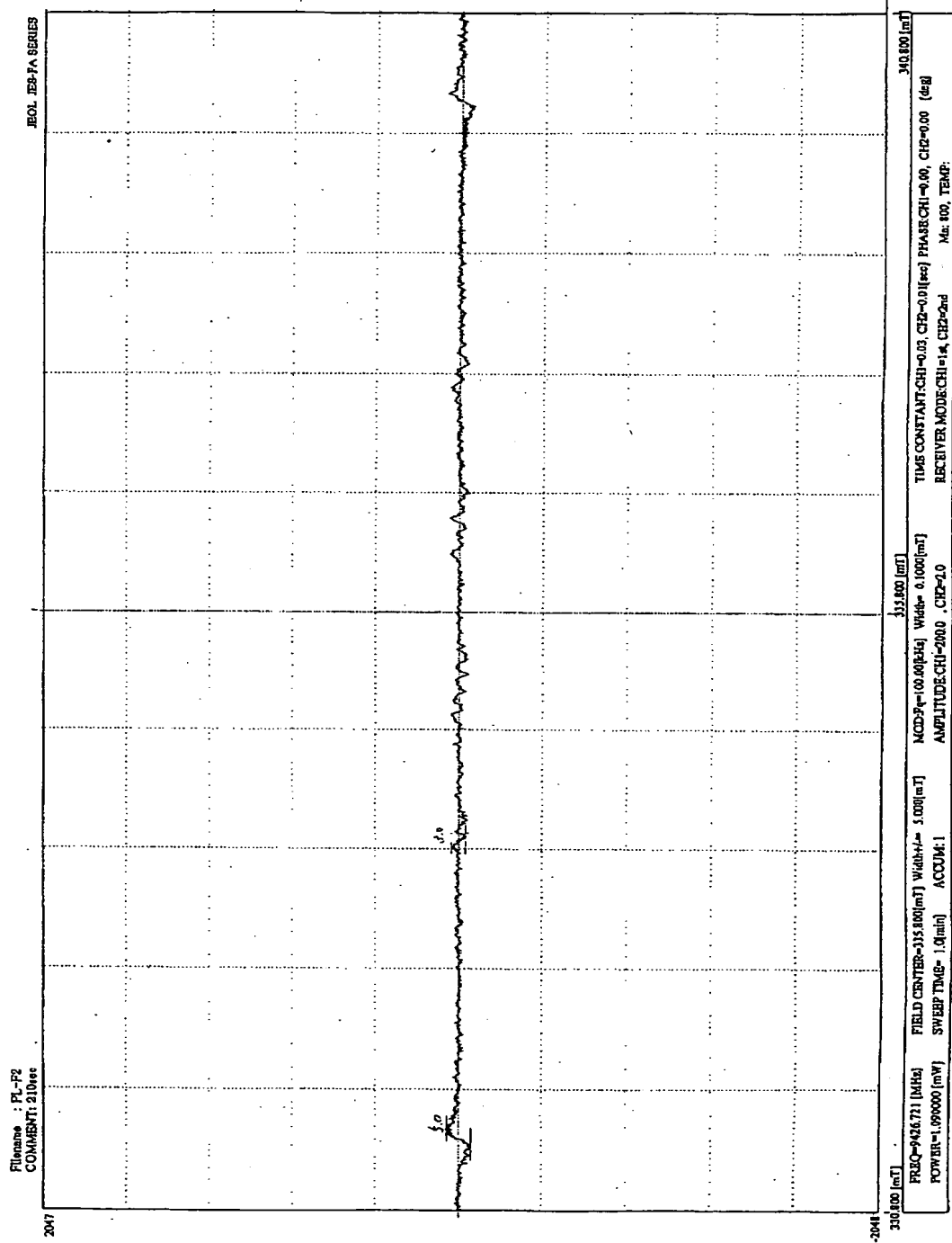
【図 11】



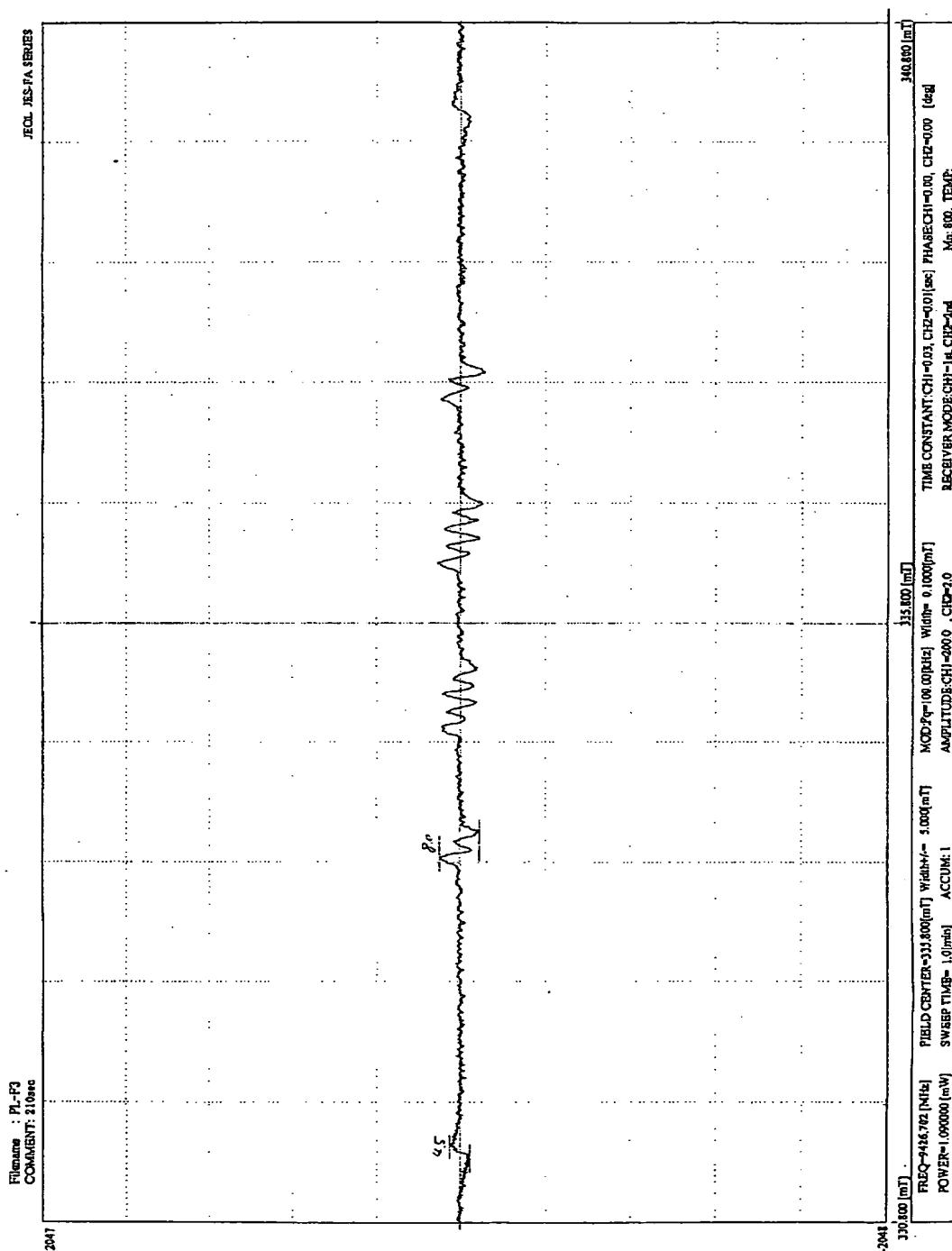
【図12】



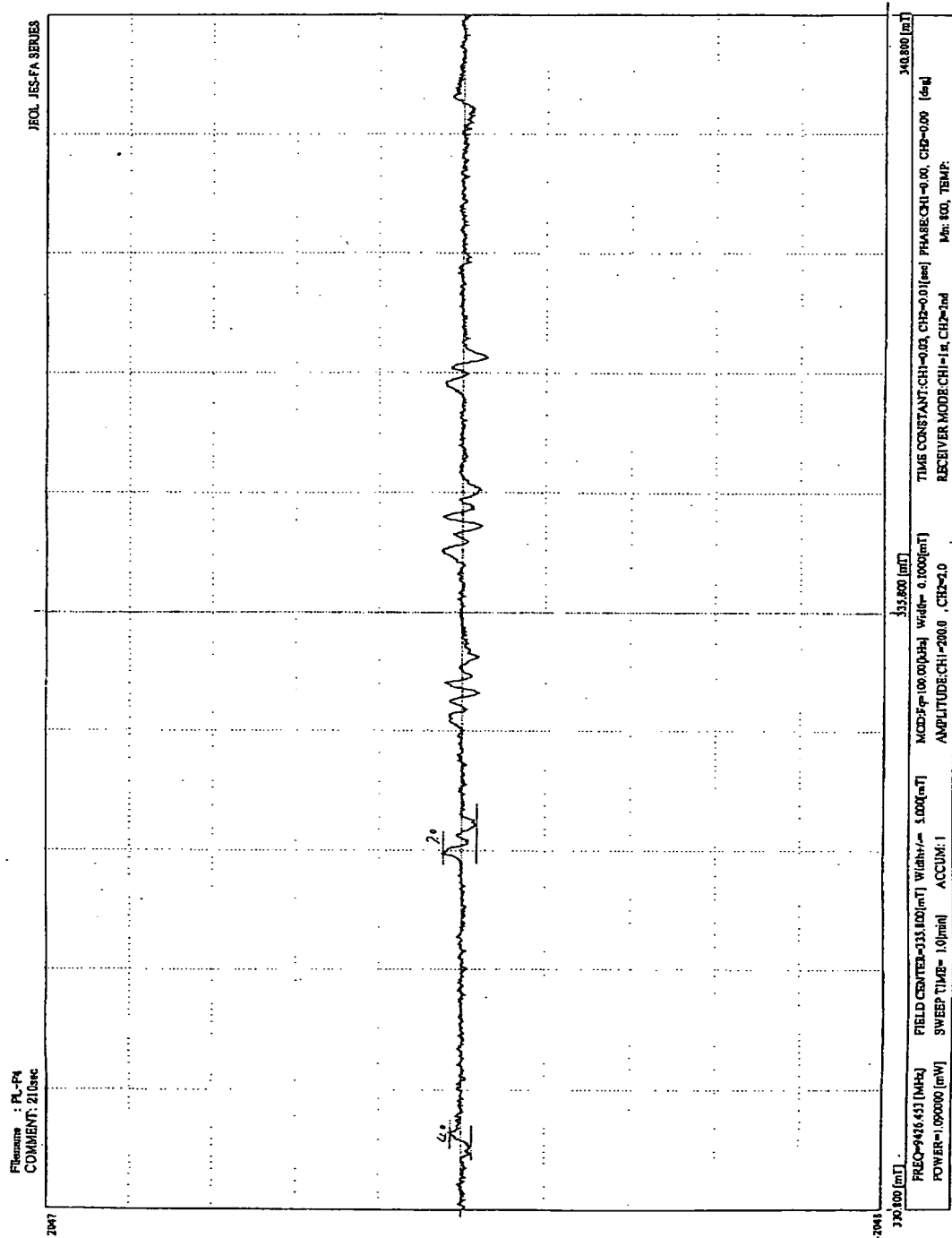
【図13】



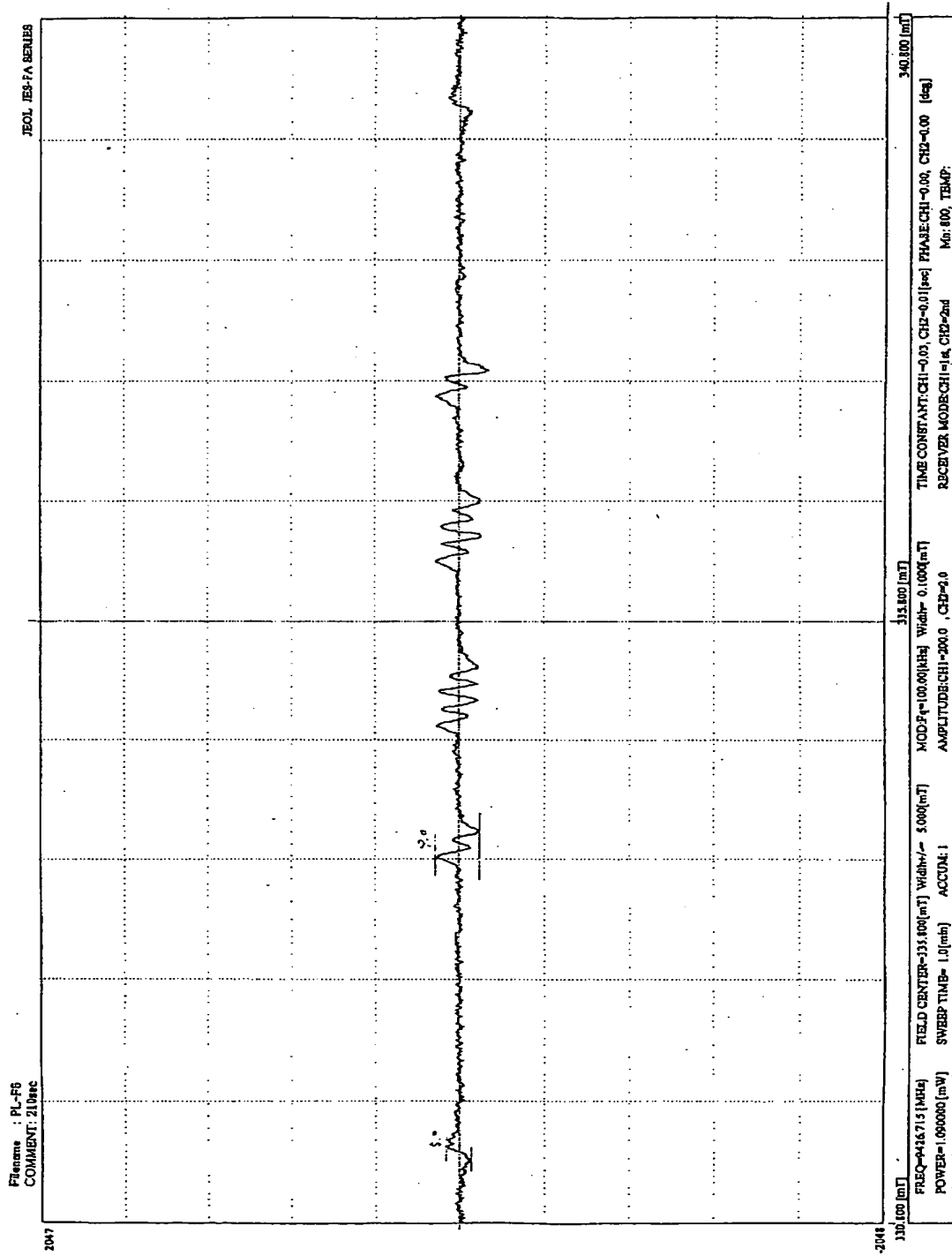
【図14】



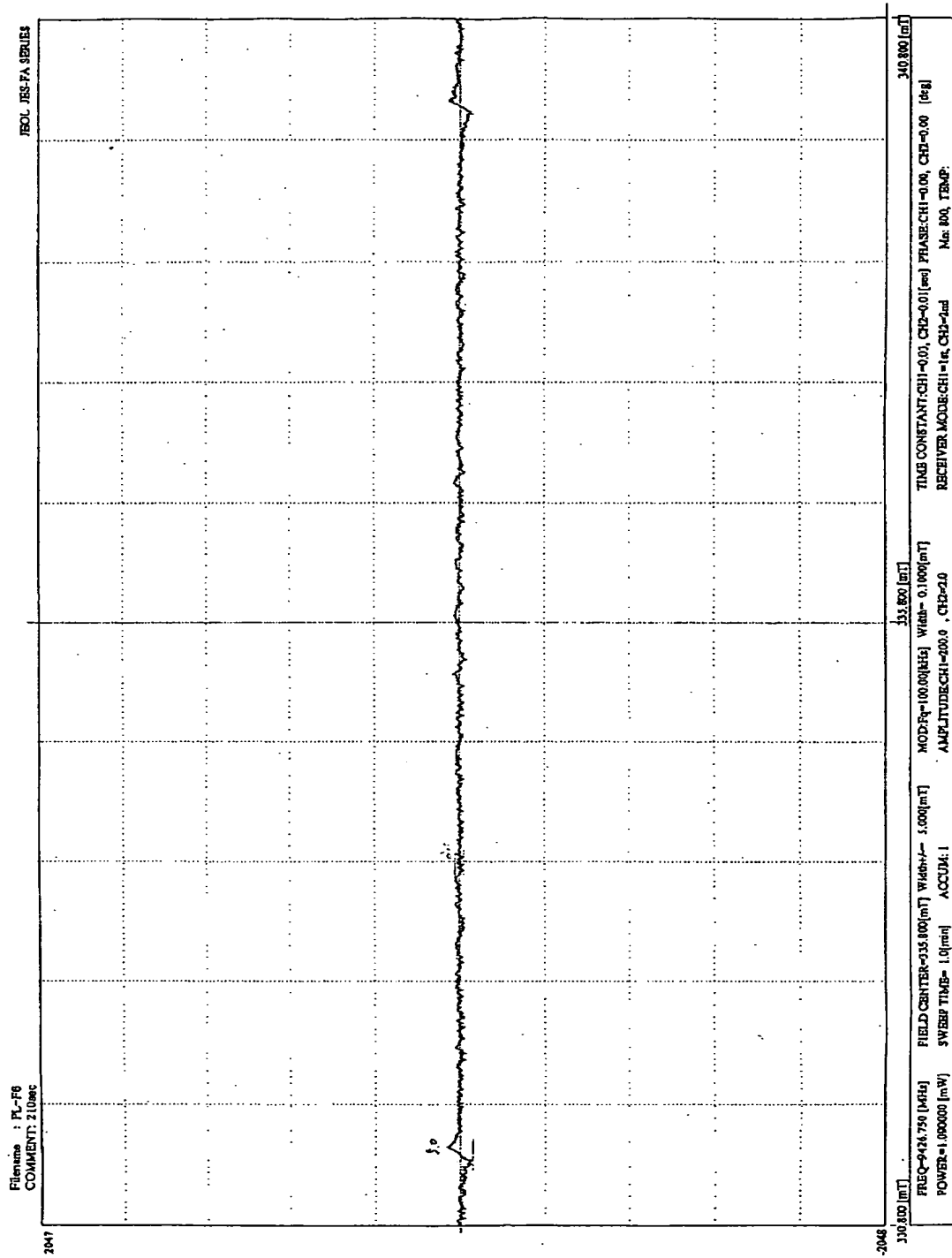
【図15】



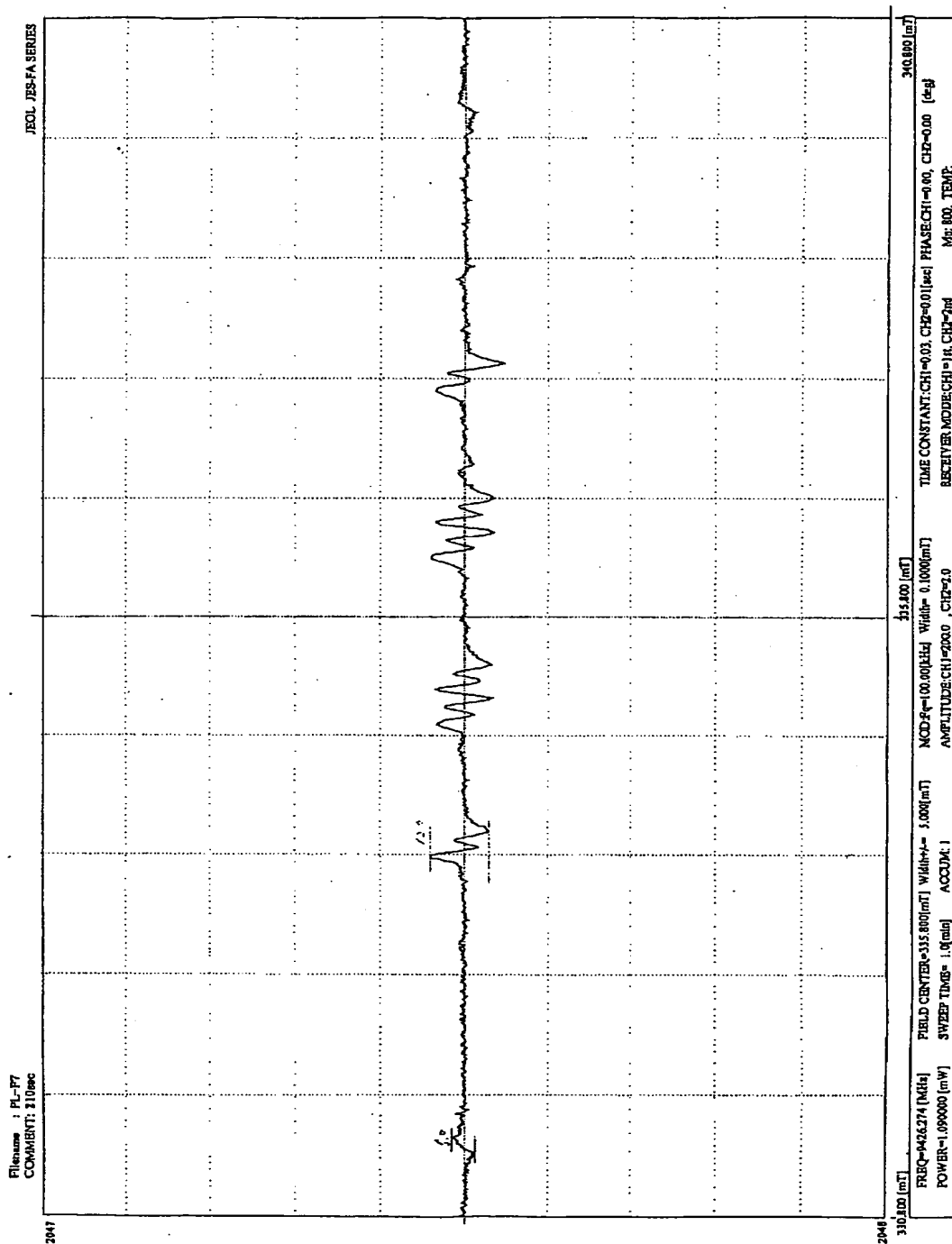
【図16】



【図17】



【図18】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD03 EE04
 4B065 AA71X AC14 BA22 BC06
 BC08 BC26 BC48 CA28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.